PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 97/15655**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Mai 1997 (01.05.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02025

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Oktober 1996 (18.10.96)

(30) Prioritätsdaten:

195 40 487.4	20. Oktober 1995 (20.10.95)	DE
196 32 404.1	2. August 1996 (02.08.96)	DE

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71)(72) Anmelder und Erfinder: SITTINGER, Michael [DE/DE]; Alt-Buckow 42c, D-12349 Berlin (DE). SCHULTZ, Olaf [DE/DE]; Steinstrasse 10, D-10119 Berlin (DE). BURMESTER, Gerd, R. [DE/DE]; Tullerweg 7, D-12277 Berlin (DE). HÄUPL, Thomas [DE/DE]; Am Schützenwäldchen 59, D-15537 Erkner (DE).

(74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Oderstrasse 21, D-10247 Berlin (DE).

(54) Title: NEW ARTIFICIAL TISSUE, METHOD FOR THE PRODUCTION AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: NEUE KÜNSTLICHE GEWEBE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to new artificial tissues which comprise three-dimensional extracellular matrixes (ECM) in cross-linkable structures, cell interaction systems for inducing artificial three-dimensional tissues and which comprise genetically manipulated cells releasing immunosuppressive or cell-differentiating factors. The tissues according to the invention are suitable for producing vital transplants and for establishing models of diseases.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue künstliche Gewebe, die aus dreidimensionalen extrazellulären Matrizes (ECM) in vernetzbaren Strukturen, Zellinteraktionssystemen zur Induktion künstlicher dreidimensionaler Gewebe sowie aus gentechnisch manipulierten Zellen, die immunsuppressive oder zelldifferenzierende Faktoren freisetzen, bestehen. Die erfindungsgemäßen Gewebe eignen sich zur Herstellung vitaler Transplantate und zur Etablierung von Krankheitsmodellen.

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Neue künstliche Gewebe, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue künstliche Gewebe, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung sowie Zellinteraktionssysteme zur Induktion künstlicher Gewebe zum Zwecke der Herstellung vitaler Transplantate und zur Etablierung von Krankheitsmodellen. Derartige Zellinteraktionskultursysteme für in vitro Organ- und Gewebemodelle eignen sich zur Herstellung dreidimensionaler Zellgewebe mit Hilfe dreidimensionaler Trägerstrukturen, die die Bildung einer extrazellulären Matrix (ECM) erlauben, aber zunächst selbst noch keine ECM aufweisen. Die enge Interaktion artifizieller Gewebe ermöglicht den Aufbau von Modellen für Erkrankungen, wobei an den Grenzzonen Zell- und Matrixveränderungen durch äußere Einflüsse, z.B. durch Medikamentengabe, geprüft werden können.

Es sind zahlreiche Zellkultursysteme bekannt, in denen eine extrazelluläre Matrix (ECM) beschrieben worden ist. So wird in der Patentschrift DE 3410631 ein Implantationsmaterial zur Wiederherstellung defekter Knorpel oder Knochen vorgestellt, das entweder in Gelform oder eingebettet in natürliches oder künstliches Knochenmaterial vorliegt. Das Gel enthält embryonale artspezifische Chondrozyten oder Mesenchymzellen und vorzugsweise auch eine extrazelluläre Matrix von Chondrozyten und Wachstumshormone. In der US (US-Patentschrift) 4801299 werden Körperimplantate in Form einer extrazellulären Matrix auf der Basis von Kollagen vorgeschlagen.

Eine Methode zur Geweberegenerierung mit Hilfe einer extrazellulären Matrix-Induktion bildet den Gegenstand der US 4935000. Extrazelluläre Matrizes finden weiterhin im Zusammenhang mit der Wiederherstellung der menschlichen Haut, kosmetischen Kompositionen (US 5055298) sowie auf Kollagen- oder Fibronektin-Basis zum Anheften von T-Zellen (US 5188959 und 5354686) Verwendung. Kollagen (Typ I) als Grundmatrix für die stationäre Phase bipolar adhärierter Hepatozyten einer Zellkultur wird in der DE 4336399 beschrieben.

Die funktionelle Immobilisierung von Enzymen, Proteinen und ganzen Zellen auf festen, biokompatiblen Trägermaterialien mittels elektrostatischer Wechselwirkung zwischen der Oberflächenbeschichtung des Festkörpers und dem zu fixierenden Adsorbat bildet den Gegenstand der DE 4323487. In der WO 92/20780 (DE 4116727) wird die gleichzeitige Kultivierung unterschiedlicher Säugerzellen, die separate Gewinnung verschiedener Säugerzellprodukte sowie die Modellierung von Organwechselwirkungen auf humoraler Ebene beschrieben.

Bei der Herstellung von Implantaten sind Verfahren bekannt geworden, die von Polymerfaserbündeln aus resorbierbarem Material ausgehen, auf das isolierte und vermehrte Zellen gebracht und die Bündel implantiert werden. In der WO 90/12603 werden dreidimensionale Trägerstrukturen genannt, die in der Form des zu ersetzenden Organs ausgebildet und mit den gewünschten Zellen versetzt sind. Bei dreidimensionalen Trägerstrukturen besteht jedoch die Schwierigkeit, die Zellen im Inneren des Implantates ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen.

Mit der DE 4306861 wird die Herstellung eines Implantates aus Zellkulturen beansprucht. Demnach werden Knorpelzellen auf eine resorbierbare, vorgeformte, dreidimensionale Trägerstruktur - die der gewünschten Struktur des Implantates entspricht - gebracht und die Struktur mit einem Material ummantelt, durch das eine Nährlösung diffundieren kann. Auf diese Weise läßt sich durch ein Aneinanderbinden von Zellen eine interzelluläre Matrix ausbilden. Das künstlich hergestellte Knorpelgewebe ist während und nach einer Transplantation einer Reihe von negativen Einflüssen ausgesetzt, die eine langfristige Stabilität des Gewebes gefährden (Buja-J et al., Ann-Rheum-Dis. 1994 Apr. 53(4): 229-34). Besonders wichtig ist dies z.B. bei Patienten, die unter Arthrose oder rheumatoider Arthritis leiden. Hier muß das implantierte Gewebe den krankhaft degenerativen und entzündlichen Prozessen lokal entgegenwirken.

Es sind mehrere Verfahren zur Herstellung transplantierbarer Knorpelersatzgewebe bekannt (Vacanti CA et al., Plastic and Reconstructive Surgery, 8:753-759, 1991; Sittinger M. et al., Biomaterials 1994, 15:451-456).

Es sind auch Möglichkeiten beschrieben worden, Zellen der Gelenkinnenhaut ex vivo mit vorwiegend antientzündlichen Genen auszustatten und dann wieder zu implantieren (Evans, C. H. and P. D. Robbins, 1994: Gene therapy for arthritis. In Gene therapeutics: Methods and applications of direct gene transfer. J. A. Wolff, editor. Birkhäuser, Boston, 312-343).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue künstliche Gewebe zur Verfügung zu stellen, Verfahren zu ihrer Herstellung zu entwickeln und ihre medizinische Anwendung zu ermöglichen.

Die Aufgabe wurde durch die Bereitstellung neuer künstlicher interagierender Gewebe gelöst, die aus neuen dreidimensionalen extrazellulären Matrizes (ECM) in vernetzbaren Strukturen, Zellinteraktionssystemen zur Induktion künstlicher dreidimensionaler Gewebe sowie aus gentechnisch manipulierten Zellen, die immunsuppressive oder zelldifferenzierende Faktoren freisetzen, bestehen.

Erfindungsgemäß werden Zellinteraktionssysteme zur Induktion künstlicher dreidimensionaler Gewebe derart eingesetzt, daß Kulturen, die eine extrazelluläre Matrix besitzen oder entwickeln, miteinander über Membranen verbunden sind oder in direktem Kontakt stehen oder miteinander vermengt sind. So erfolgt die Induktion eines artifiziellen Zellgewebes zu z.B. Knorpel- oder Knochengewebe durch transfizierte Zellkulturen oder dreidimensionale Kulturen von Periost- oder Perichondriumzellen. Die Aufgabe, eine Stabilisierung der Transplantate zu erreichen, wurde durch eine genetische Manipulation von Zellen gelöst, insbesondere dadurch, daß menschliche Zellen mit bestimmten Genen, z.B. bone morphogenic protein, Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist oder TGF-ß ausgestattet und danach zu einem neuen Knorpelgewebe gezüchtet werden.

Die Erfindung besteht in einer Kombination neuer und bekannter Elemente, die derart zusammenwirken, daß Produkte mit neuen und verbesserten Eigenschaften entstehen.

Das erfindungsgemäße Zellinteraktionssystem (Figur 1) besteht aus der Nährlösung/ dem Kühlbehälter 1, der Tropfenbildungskammer 2, der Mischungskammer 3, der Perfusionskammer 4 (mit Wärmeplatte), der Mengenmessungseinrichtung 5 (optische Kontrolle), der Probeentnahme 6, der Mediumauslaufkammer 7 und dem Interface/ PC 8.

Erfindungsgemäß werden dreidimensionale Zellgewebe mit Hilfe dreidimensionaler Trägerstrukturen, z.B. resorbierbare Polymervliese, hergestellt. Für die Herstellung eines Knorpelgewebes z.B. werden entdifferenzierte (vermehrte) Knorpelzellen oder undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen verwendet. Differenzierte Knorpelzellen vom Patienten stehen normalerweise nur in geringer Menge (operativer Eingriff notwendig) zur Verfügung.

Um ein differenzierendes Mikromilieu zu schaffen, wird a) eine undifferenzierte Zellsuspension mit körpereigenen Zellen oder Zellaggregaten eines definierten (differenzierten) Phänotyps gemischt, werden b) definierte (z.B. differenzierte) oder genetisch manipulierte körperfremde Zellen in einem Gel oder Vlies suspendiert und um das Gewebe herum bzw. direkt an das zu differenzierende Gewebe gelagert.

Die Anordnung dieses Verfahrens stellt eine definierte Kontaktzone zwischen zwei artifiziellen dreidimensionalen Zellgeweben her. Diese Kontaktzone dient als Testsystem für Erkrankungen. An den Grenzzonen können Zell- und Matrixveränderungen, z.B. bei der Gabe von Medikamenten, geprüft werden.

Die erfindungsgemäßen Interaktionszellkultursysteme eignen sich zur Verwendung als in vitro Organ- und Gewebemodelle.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß z.B. die Induktion eines artifiziellen Zellgewebes zu Knorpel- oder Knochengewebe durch transfizierte Zellkulturen oder dreidimensionale Kulturen von Periost- oder Perichondriumzellen, die eine extrazelluläre

Matrix entwickeln oder besitzen, den Aufbau von Modellen für Erkrankungen erlauben, bei denen insbesondere die extrazelluläre Matrix eine Rolle spielt. Die Verwendung der neuen interagierenden künstlichen Gewebe besteht in der Herstellung vitaler Transplantate, die zur in-vitro Simulation pathogenetischer und infektiöser Prozesse, zur Etablierung von Krankheitsmodellen und zur Testung von Wirkstoffen geeignet sind.

Figur 2 zeigt Zell- und Gewebeanordnungen

Serielle Kultur: Faktoren aus dem Gewebe (links) wirken auf das Gewebe rechts. Der Faktor aus dem Gewebe rechts wirkt nicht auf das Gewebe links.

Sandwich-Kultur: Zwei oder mehrere künstliche Gewebe liegen übereinander oder aneinander (Kontaktzonen).

Integrierte Kultur: Dabei handelt es sich um eine Mischung unterschiedlicher Zellen zum Zwecke der Differenzierung eines Gewebes.

Fließende Zellen: Ein Gemisch suspendierter Zellen (z.B. Lymphozyten oder auch Mikroorganismen) strömen entlang eines artifiziellen Gewebes (z.B. Endothel) und haften dort an, wenn die Zellen passende Rezeptoren exprimieren.

Figur 3:

- oberes Bild: Der Zweck der Zellmischung besteht darin, mit den wenigen differenzierten bzw. differenzierenden Zellen möglichst viele der undifferenzierten Zellen zu differenzieren. 80% der undifferenzierten mesenchymalen Zellen und 20% der differenzierten Knorpelzellen befinden sich zusammen in einem Gewebe (Gewebe 1). Körperfremde oder genetisch manipulierte Zellen werden, wenn sie differenzierende Faktoren produzieren, um das Gewebe 1 herum angeordnet.
- unteres Bild (Kontaktzone): Bei der rheumatoiden Arthritis zerstören synoviale Zellen in den Gelenken der Patienten den Gelenkknorpel, indem seine Oberfläche und extrazelluläre Matrix zerstört werden und schließlich synoviale Zellen in den Knorpel eindringen.

Die erfindungsgemäß stabilisierten transplantierbaren Knorpelgewebe bestehen aus einer neuen extrazellulären Matrix (ECM) in dreidimensionalen Strukturen, aus vermehrten Knorpelzellen, aus vernetzbaren / polymerisierbaren Polypeptiden oder Polysacchariden und aus Zellen, die aufgrund gentechnischer Manipulation Matrixmoleküle, immunsuppressive oder zelldifferenzierende Faktoren freisetzen. Ihre Strukturen sind aus dreidimensionalen Faserstrukturen, dreidimensionalen Geweben, aus Fibrin und aus einer das künstliche Knorpelsystem umgebenden semipermeablen Membran zusammengesetzt.

Eine gewünschte Form setzt sich z.B. aus einem Silicon-Negativ, Faserwolle oder Faserstrukturen aus resorbierbaren Polymeren, wie a-Hydroxysäuren und die semipermeable Membran aus Polyelektrolytkomplexen, wie Polylysin oder Hyaluronsäure zusammen.

Die Verfahren zur Herstellung von transplantierbarem Knorpelgewebe bestehen darin, daß polymerisierbare Lösungen enthaltende Knorpelzellsuspensionen und gentherapeutisch veränderte Zellen in dreidimensionale Strukturen gefüllt, mit Thrombin oder polymerisationsinduzierenden Faktoren verfestigt, die Zellen in dieser dreidimensionalen Struktur eine neue extrazelluläre Matrix (ECM) produzieren und das Knorpelsystem mit einer semipermeablen Membran umgeben wird.

Die polymerisierbaren Lösungen bestehen aus vernetzbaren / polymerisierbaren Polypeptiden oder Polysacchariden und die veränderten Zellen aus solchen, die aufgrund gentechnischer Manipulation Matrixmoleküle, immunsuppressive oder zelldifferenzierende Faktoren freisetzen.

Als Polypeptid wird Fibrinogen in der Weise eingesetzt, daß fibrinogenhaltige Zellsuspensionen in Strukturen aus dreidimensionalen Faserstrukturen oder aus dreidimensionalen Geweben gefüllt und mit Thrombin verfestigt werden.

Das Fibrinogen wird aus dem Patienten gewonnen, von dem die Zellen stammen und/oder in den das dreidimensionale Knorpelgewebe implantiert werden soll.

Erfindungsgemäß werden alle oder ein Teil der Zellen mit einem oder mehreren der folgenden Gene gentherapeutisch verändert: TGF-ß, bone morphogenetic proteins, Morphogene, Rezeptoren für Morphogene, antiinflammatorische Zytokine, Zytokinantagonisten, wie IL-1- Antagonisten, IL-1-Rezeptorantagonist, TNF-Antagonisten oder mit Proteaseinhibitoren (TIMP, PAI).

Dabei lassen sich verschiedene Zellen mit jeweils nur einer genetischen Manipulation oder mehrere Zellen mit verschiedenen genetischen Manipulationen mit unveränderten Zellen kombinieren. Die eingebrachten Gene werden vorübergehend oder permanent exprimiert.

Überraschenderweise lassen sich Formgebung und genetische Manipulation einsetzen, um eine Polarisierung, basierend auf einer ungleichen Verteilung von genetisch manipulierten Zellen und unveränderten Zellen, zu erreichen.

Ein weiteres Merkmal der Erfindung besteht darin, daß genetisch manipulierte und unveränderte Zellen in getrennte künstliche Gewebe eingebracht und geformt und zu einem Gesamtgewebe kombiniert oder geformte Gewebe mit genetisch manipulierten Zellen und Gewebe mit unveränderten Zellen schichtweise oder durch Umhüllung oder zwei bzw. mehrere Gewebe mit jeweils verschiedenen genetischen Manipulationen schichtweise oder durch Umhüllung kombiniert werden.

Gewebe, die genetisch manipulierte Zellen enthalten, lassen sich mit Geweben, die genetisch unveränderten Zellen enthalten, kombinieren.

Die erfindungsgemäß hergestellten Knorpelgewebe besitzen insbesondere immunsuppressive Eigenschaften.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß die erfindungsgemäße Vorgehensweise zum in vivo Schutz und zur in vivo Erhaltung in vitro hergestellter Knorpelgewebe geeignet ist und daß die erfindungsgemäßen Knorpelgewebe zur Therapie von Knorpelschäden bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eingesetzt werden können. Es ist ferner überraschend, daß die erfindungsgemäß eingesetzte semipermeable Membran, mit der die hergestellte Knorpelgewebe vor, während und einige Zeit nach der Implantation umgeben werden, Schutz bieten vor immunologischen und dedifferenzierenden Reaktivitäten.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Dreidimensionales Zellgewebe

Ein dreidimensionales Zellgewebe wird mit Hilfe dreidimensionaler Trägerstrukturen (resorbierbares Polymervlies) hergestellt. Für die Herstellung eines Knorpelgewebes werden (a) entdifferenzierte (vermehrte) Knorpelzellen oder (b) undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen verwendet. Die in der Vliesstruktur zu verteilenden Zellen werden dabei erst in einer Fibrinogenlösung suspendiert. Die Zellsuspension wird in den Vlieskörper gefüllt und durch Thrombinzugabe verfestigt.

Beispiel 2: Differenzierendes Mikromilieu

Um ein differenzierendes Mikromilieu zu schaffen, wird (A) eine undifferenzierte Zellsuspension mit körpereigenen Zellen oder Zellaggregaten eines differenzierten Phänotyps 5:1 gemischt, (B) differenzierte - aber körperfremde - Zellen in einem Gel oder Polymervlies suspendiert und rund um das Gewebe bzw. direkt an das zu differenzierende Gewebe angelagert.

Das differenzierende Mikromilieu kann

1. durch differenzierte Knorpelzellen
2. mit BMP (bone morphogenetic protein) transfizierten Zellen

3. mit allen Zellen (Periost und Perichondriumzellen), Geweben (Periost, Synovia) oder Gewebekomponenten (Matrix), die parakrin Knorpel-differenzierende Faktoren produzieren oder freisetzen,

geschaffen werden. Derzeit bekannte Faktoren sind z.B. bone morphogenetic proteins, cartilage drived morphogenetic proteins, transformig growth factor beta (Luyten, F.P. et al., Acta Orthop. Belg., 58 Suppl. 1 (1992) 263-267; Exp. Cell Res. 1994, 210: 224-9; Chang, S.C. et al., J. Biol. Chem. 1994, 269: 28227-28234).

Die Anordnung dieses Verfahrens stellt eine definierte Kontaktzone zwischen zwei artifiziellen dreidimensionalen Zellgeweben her.

Beispiel 3: Modell Rheumatoide Arthritis

Aggressive Zellen aus der Synovia eines Patienten mit rheumatoider Arthritis (3D-Gewebe 1) invadieren das Knorpelzellgewebe (3D-Gewebe 2) in vitro.

Beispiel 4: Knorpelgewebe

Vermehrte Knorpelzellen oder mesenchymale Vorläuferzellen unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsgrades werden in einer Fibrinogenlösung suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymervlies verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt und durch Thrombinzugabe verfestigt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt.

Beispiel 5: Knochengewebe

Zellen osteogenen Ursprungs unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungs-grades oder mesenchymale Vorläuferzellen werden in einer Fibrinogenlösung suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymerkonstukt verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt und durch Thrombinzugabe verfestigt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt.

Beispiel 6: Modell "Rheumatoide Arthritis / in-vitro Pannusgewebe"

Zellen der Synovialmembran eines Patienten mit rheumatoider Arthritis (3D-Gewebe 1) treten wie im Beispiel 3 mit Knorpelzellgewebe (3D-Gewebe 2) in vitro in Wechselwirkung.

Beispiel 7: Transplantation von künstlich hergestelltem Knorpelgewebe zur Therapie von Knorpelschäden bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

Mesenchymale Zellen einer Gewebeprobe eines Patienten werden in vitro ausreichend in Monolayerkultur vermehrt und teilweise mit einem Gen für BMP (bone morphogenetic protein) transfiziert. Die Zellen werden in einer fibrinogenhaltigen Lösung suspendiert und dann in eine Trägerstruktur gebracht (z.B. resorbierbare Polymervliese aus Polylaktid und Polyglykolid). Die Suspension wird dann in der Struktur durch Thrombinzugabe verfestigt. Das Gewebe kann sofort oder nach einer in vitro Reifung in das Gelenk des Patienten transplantiert werden.

Beispiel 8: Andere künstliche Gewebe - Knochen, Leber, Niere, Gefäße, Haut

Vergleichbar zu Beispiel 1 wird ein Teil der Zellen mit einem gewünschten Gen manipuliert und diese gentherapeutisch veränderte Population unter Verwendung von Trägerstrukturen und Fibrin in eine bestimmte Form gebracht. Dieser Struktur werden dann genetisch unveränderte Zellen ebenfalls unter Verwendung formgebender Strukturen angelagert, so daß ein Diffusions- und damit Wirkungsgradient für gentechnisch eingebrachte Wirkstoffe auf die unbehandelten Zellen einwirken kann. Dies dient zur Polarisierung der in vitro hergestellten Gewebestrukturen vergleichbar der Polarisierung im nativen Gelenkknorpel.

Patentansprüche

1. Neue künstliche Gewebe, bestehend aus neuen dreidimensionalen extrazellulären Matrizes (ECM) in vernetzbaren Strukturen, Zellinteraktionssystemen zur Induktion künstlicher dreidimensionaler Gewebe sowie aus gentechnisch manipulierten Zellen, die immunsuppressive oder zelldifferenzierende Faktoren freisetzen.

2. Gewebe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellinteraktionssysteme zur Induktion künstlicher dreidimensionaler Gewebe aus Kulturen bestehen, die eine extrazelluläre Matrix besitzen oder entwickeln, miteinander über Membranen verbunden sind oder in direktem Kontakt stehen oder miteinander vermengt sind.

3. Gewebe und Zellinteraktionssysteme nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Induktion eines artifiziellen Zellverbandes zu Knorpel- oder Knochengewebe genetisch manipulierte Zellen oder dreidimensionale Kulturen von Periost- oder Perichondriumzellen in einem differenzierenden Mikromilieu eingesetzt werden.

4. Verfahren zur Herstellung neuer künstlicher Gewebe mit Hilfe von Zellinteraktionssystemen, dadurch gekennzeichnet, daß vermehrbare Zellen unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsgrades suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymervlies verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt werden.

5. Verfahren zur Herstellung neuer Gewebe nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur Gewinnung eines Knorpelgewebes mit Hilfe des Zellinteraktionssystems vermehrte Knorpelzellen oder mesenchymale Vorläuferzellen unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsgrades in einer Fibrinogenlösung suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymervlies verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt, durch Thrombinzugabe verfestigt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt werden.

6. Verfahren zur Herstellung neuer Gewebe nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur Gewinnung eines Knochengewebes mit Hilfe des Zellinteraktionssystems Zellen

osteogenen Ursprungs unterschiedlichen Reifungs- und Differenzierungsgrades oder mesenchymale Vorläuferzellen in einer Fibrinogenlösung suspendiert, die Zellsuspension in einem resorbierbaren Polymerkonstrukt verteilt, Faktoren oder Komponenten der entsprechenden extrazellulären Matrix, die dem Wachstums- und Differenzierungsprozeß förderlich sind, zugesetzt, durch Thrombinzugabe verfestigt und einem differenzierenden Mikromilieu ausgesetzt werden.

7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung eines differenzierenden Mikromilieus eine Suspension voher vermehrter, undifferenzierter Zellen mit autologen Zellen oder Zellaggregaten eines definierten Phänotyps gemischt und in direkten Kontakt mit einem Gel oder Polymervlies, das differenzierte, körperfremde Zellen enthält, gebracht wird.

8. Verfahren nach Anspruch 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das differenzierende Mikromilieu

a) durch differenzierte Knorpelzellen

b) mit BMP (bone morphogenetic protein), TGF oder verwandte Faktoren produzierende Zellen, wobei diese in unterschiedlicher Weise zweckentsprechend genetisch manipuliert sein können,

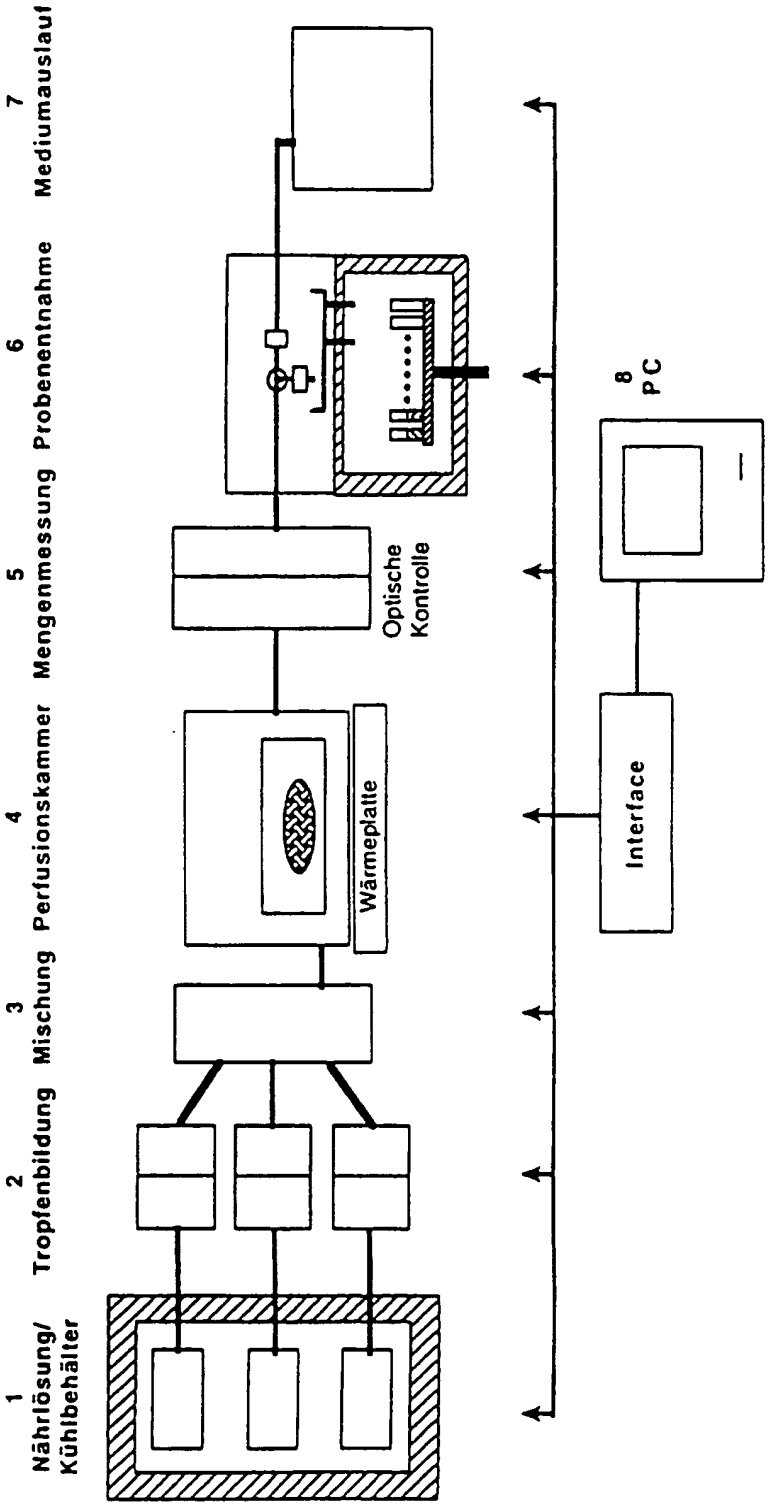
c) durch alle Zellen (z.B. Periost- oder Perichondriumzellen), Gewebe (Periost, Synovia) oder Gewebekomponenten (Matrix), die knorpeldifferenzierende Faktoren produzieren oder freisetzen,

erzeugt wird.

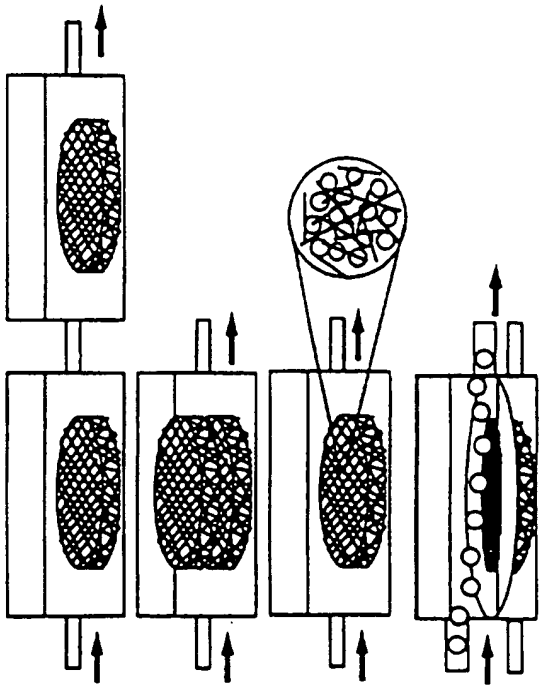
9. Verwendung neuer interagierender künstlicher Gewebe nach Anspruch 1 bis 8 zur Herstellung vitaler Transplantate, zur in-vitro Simulation pathogenetischer und infektiöser Prozesse, zur Etablierung von Krankheitsmodellen und zur Testung von Wirkstoffen.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Etablierung eines Modells "Rheumatoide Arthritis / in-vitro Pannusgewebe" Zellen der Synovialmembran eines Patienten mit rheumatoider Arthritis (3D-Gewebe 1) mit Knorpelzellgewebe (3D-Gewebe 2) in vitro in Wechselwirkung treten.

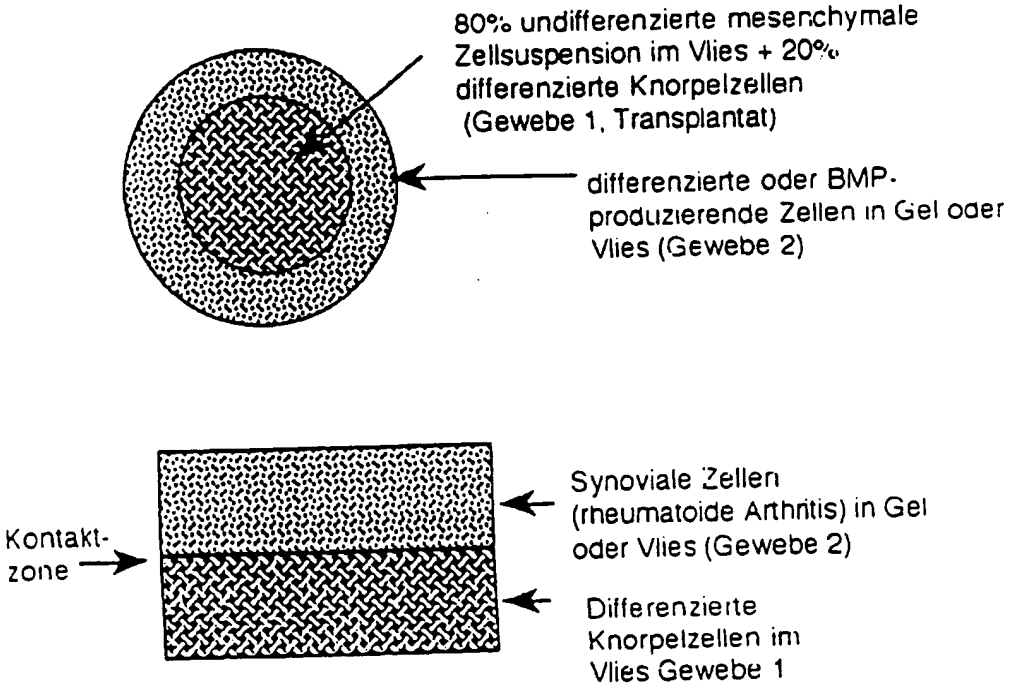
Figur 1


1
Nährlösung/
Kühlbehälter
2
Tropfenbildung
3
Mischung
4
Perfusionskammer
5
Mengenmessung
6
Probenentnahme
7
Mediumauslauf
Optische
Kontrolle
Wärmeplatte
Interface
8
PC

Figur 2


serial culture
sandwich culture
integrated culture
perfusing cells

Figur 3


80% undifferenzierte mesenchymale Zellsuspension im Vlies + 20% differenzierte Knorpelzellen (Gewebe 1, Transplantat)
differenzierte oder BMP-produzierende Zellen in Gel oder Vlies (Gewebe 2)
Kontakt-zone
Synoviale Zellen (rheumatoide Arthritis) in Gel oder Vlies (Gewebe 2)
Differenzierte Knorpelzellen im Vlies Gewebe 1

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☑ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.